

10/577084

IAP20 Rsc'd PCT/FR 24 APR 2006

Souches de microorganismes optimisées pour des voies de biosynthèse consommatoires  
de NADPH

5 Le NADP (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) participe sous sa forme réduite, NADPH, aux réactions intracellulaires d'oxydoréductions impliquant des enzymes à activité déshydrogénase ou réductase.

La présente invention concerne des souches de microorganismes optimisées pour la production par biotransformation, de molécules ayant des voies de biosynthèse 10 consommatoires de NADPH. Les souches selon l'invention sont utilisables dans des procédés de biotransformation consommateurs de NADPH. Les souches définies selon l'invention peuvent être procaryotiques ou eucaryotiques. Dans un mode de réalisation préféré, ladite souche procaryotique est une souche *d'Escherichia coli*. Dans un autre mode de réalisation, ladite souche eucaryotique est une souche de *Saccharomyces*, en particulier *S. cerevisiae*.

15 La présente invention concerne également un procédé de préparation de molécules par biotransformation comprenant la culture dans un milieu approprié d'une souche optimisée selon l'invention, ladite souche optimisée comprenant également les éléments génétiques nécessaires à la préparation de ladite molécule.

Les procédés de biotransformation ont été développés pour permettre la production de 20 molécules en grande quantité à des coûts faibles, tout en permettant également la valorisation de différents sous-produits industriels ou de l'agriculture.

Pour produire des molécules d'intérêt par biotransformation *in vivo* on distinguera deux grandes approches :

- d'une part la fermentation qui permet la production de molécules par un microorganisme à partir d'une source de carbone simple (e.g. WO0102547 qui décrit la production de lysine par fermentation de *C. glutamicum* en présence de glucose),
- d'autre part la bioconversion par un microorganisme d'un co-substrat donné en une molécule d'intérêt (e.g. WO0012745 qui décrit la production de dérivés R-pipéridine, WO0068397 qui décrit la production de tagatose). Le co-substrat est non assimilable ; il est différent de la source de carbone qui est utilisée seulement pour produire la biomasse et le NADPH nécessaire à la bioconversion.

L'amélioration d'un procédé de biotransformation peut porter sur différents facteurs comme la température, l'oxygénation, la composition du milieu, le procédé de récupération, etc. On peut aussi envisager de modifier le microorganisme de telle sorte que la production de la molécule d'intérêt et/ou son excrétion soit augmentée.

5 Dans le cadre d'une fermentation on s'attachera par exemple à optimiser la voie de biosynthèse, par exemple en modifiant la régulation des gènes ou en modifiant les gènes afin de modifier les caractéristiques des enzymes impliquées, ou encore en optimisant la régénération des cofacteurs.

10 Dans le cadre de la bioconversion on s'attachera davantage à réduire la formation de co-produits et à optimiser la régénération de cofacteurs impliqués dans la ou les étapes de bioconversion.

15 Parmi les cofacteurs impliqués dans les biotransformations, le NADPH prend une part importante notamment pour la production des acides aminés (e.g. arginine, proline, isoleucine, méthionine, lysine), de vitamines (e.g. panthoténate, phylloquinone, tocophérol), de molécules aromatiques (e.g. WO9401564), de polyols (e.g. xylitol), de polyamines (e.g. spermidine), d'hydroxyesters (e.g. éthyl-4-chloro-3-hydroxybutyrate) ou d'autres molécules à haute valeur ajoutée.

La présente invention concerne donc une souche de microorganismes optimisée pour la production de molécules ayant des voies de biosynthèse consommatoires de NADPH.

20 Au lieu d'essayer d'optimiser pour chaque biotransformation le ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> dans le microorganisme, les inventeurs ont opté pour la production de microorganismes modifiés afin d'obtenir différents ratios NADPH/NADP<sup>+</sup>, lesdits microorganismes modifiés étant ensuite employés pour réaliser les biotransformations consommatoires de NADPH.

25 Par souche de microorganismes, on entend selon l'invention un ensemble de microorganismes d'une même espèce comprenant au moins un microorganisme de ladite espèce. Ainsi, les caractéristiques décrites pour la souche s'appliquent à chacun des microorganismes de ladite souche. De même, les caractéristiques décrites pour l'un des microorganismes de la souche s'appliqueront à l'ensemble desdits microorganismes la 30 composant.

Parmi les microorganismes optimisés selon l'invention, on citera les bactéries et les levures, les champignons filamenteux et notamment les bactéries et les levures des espèces suivantes : *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevibacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Penicillium sp.*, *Pichia sp.*, *Pseudomonas sp.*,  
5 *Rhodococcus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Candida sp.*

Le principe de l'optimisation du ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> est décrit ci-après pour *E. coli* et *S. cerevisiae*. Le même principe peut être appliqué de manière similaire à tous les microorganismes cultivés en conditions aérobie.

Le principe de l'optimisation du ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> consiste à limiter les activités enzymatiques impliquées dans l'oxydation du NADPH, et/ou à favoriser les activités enzymatiques permettant la réduction du NADP<sup>+</sup>. On limite les activités enzymatiques impliquées dans l'oxydation du NADPH en diminuant, et plus particulièrement en inactivant, de telles activités, notamment les activités de type quinone oxidoreductase et/ou transhydrogénase soluble. On favorise les activités enzymatiques permettant la réduction du NADP<sup>+</sup> en imposant le flux de carbone via le cycle des pentoses phosphate et/ou en modifiant la spécificité de cofacteur d'au moins une enzyme de telle sorte qu'elle utilise le NADP préférentiellement au NAD, son cofacteur habituel.  
10  
15

Les souches optimisées selon l'invention sont obtenues par biologie moléculaire. L'homme du métier connaît les protocoles permettant de modifier le caractère génétique des microorganismes. Les techniques de transformation sont documentées et sont à la portée de l'homme du métier (Sambrook *et al.*, 1989 Molecular cloning : a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).  
20

Les procédés permettant de limiter une activité enzymatique consistent à modifier le gène permettant son expression par un moyen approprié, par exemple en apportant une ou plusieurs mutation(s) dans la partie codante du gène concerné, ou en modifiant la région promotrice, notamment en la remplaçant par une séquence permettant de diminuer l'expression du gène.  
25

Les procédés permettant d'inactiver une activité enzymatique consistent à inactiver le produit d'expression du gène concerné par un moyen approprié, ou bien à inhiber l'expression du gène concerné, ou encore à déléter au moins une partie du gène concerné, de manière à ce que soit son expression n'ait pas lieu (par exemple délétion d'une partie ou de l'ensemble de la  
30

région promotrice nécessaire à son expression), soit le produit d'expression ait perdu sa fonction (par exemple délétion dans la partie codante du gène concerné).

De manière préférentielle, la délétion d'un gène comprend la suppression de l'essentiel dudit gène, et le cas échéant son remplacement par un gène marqueur de sélection permettant 5 de faciliter l'identification, l'isolement et la purification des souches optimisées selon l'invention.

L'inactivation d'un gène chez *E. coli* se fait préférentiellement par recombinaison homologue (Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-10 6645). Le principe d'un protocole en est rappelé brièvement : on introduit dans la cellule un fragment linéaire, obtenu *in vitro*, comprenant les deux régions flanquant le gène, et au moins un gène de sélection entre ces deux régions (généralement un gène de résistance à un antibiotique), ledit fragment linéaire présentant donc un gène inactivé. On sélectionne les 15 cellules ayant subi un événement de recombinaison et ayant intégré le fragment introduit par étallement sur milieu sélectif. On sélectionne ensuite les cellules ayant subi un événement de double recombinaison, dans lesquelles le gène natif a été remplacé par le gène inactivé. Ce protocole peut être amélioré en utilisant des systèmes de sélections positive et négative, afin 15 d'accélérer la détection des événements de double recombinaisons.

L'inactivation d'un gène chez *S.cerevisiae* se fait également préférentiellement par 20 recombinaison homologue (Baudin *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 21, 3329-3330, 1993; Wach *et al.*, *Yeast* 10, 1793-1808, 1994; Brachmann *et al.*, *Yeast*. 14 :115-32, 1998).

Les procédés permettant de favoriser une activité enzymatique consistent à stabiliser 25 le produit d'expression du gène concerné par un moyen approprié par exemple en diminuant sa sensibilité à des effecteurs allostériques, ou bien à augmenter l'expression du dit gène de manière à augmenter la quantité d'enzyme.

La surexpression d'un gène peut être effectuée par changement du promoteur de ce gène *in situ*, par un promoteur fort ou *inductible*. De façon alternative, on introduit, dans la cellule, un plasmide réplicatif (simple ou multicopies) dans lequel le gène que l'on désire surexprimer est sous le contrôle du promoteur adéquat. Dans le cas de modification 30 d'*Escherichia coli*, on pourra par exemple utiliser les promoteurs *P<sub>lac</sub>-o*, *P<sub>trc</sub>-o*, *p<sub>tac</sub>-o*, trois promoteurs forts bactériens pour lesquels l'opérateur lac (*lacO*) a été délété pour les rendre

constitutifs. Dans le cas de modifications de *Saccharomyces cerevisiae*, on pourra par exemple utiliser les promoteurs *Ppgk*, *Padh1*, *Pgal1*, *Pgal10*.

Les procédés permettant de modifier la spécificité de cofacteur d'une enzyme de telle sorte qu'elle utilise le NADP préférentiellement au NAD, consistent à modifier la séquence du 5 gène permettant l'expression de cette enzyme (Bocanegra, J.A. Scrutton, N.S. ; Perham, R.N. (1993) Creation of an NADP-dependent pyruvate dehydrogenase multienzyme complex by protein engineering. *Biochemistry* 32 : 2737-2740).

Les souches optimisées selon l'invention (*i.e.* capacité accrue de réduction du NADP<sup>+</sup>) comprennent l'atténuation voire l'inactivation, d'une ou plusieurs activité(s) enzymatique(s) oxydant le NADPH, et en particulier, des activités de type quinone oxidoréductase et/ou transhydrogénase soluble.

On citera pour exemples d'enzymes oxydant le NADPH et sans que cette liste soit limitative les activités et les gènes suivants :

Activités enzymatiques	Numéro EC	Gènes <i>E. coli</i>	Gènes <i>S. cerevisiae</i>
Alcool déshydrogénase	1.1.1.2	<i>yahK</i>	ADH6
Aldose réductase	1.1.1.21		GRE3
Shikimate déshydrogénase	1.1.1.25	<i>aroE</i>	ARO1
Méthylglyoxal réductase	1.1.1.78		GRE2p
Gamma-glutamyl phosphate réductase	1.2.1.41	<i>proA</i>	PRO2
2,4-diénoyl coenzyme A réductase	1.3.1.34	<i>fadH</i>	
Glutamate déshydrogénase	1.4.1.4	<i>gdhA</i>	GDH1, GDH2
Glutamate synthase	1.4.1.13	<i>gltB, gltD</i>	GLT1
Méthylène-tétrahydrofolate déshydrogénase	1.5.1.5	<i>folD</i>	ADE3, MIS1
Transhydrogénase soluble	1.6.1.1	<i>udhA</i>	
Transhydrogénase membranaire	1.6.1.2	<i>pntA, pntB</i>	
Quinone oxidoréductase	1.6.5.5	<i>qor</i>	ZTA1
Nitrite réductase	1.7.1.4	<i>nirB, nirD</i>	
Sulfite réductase	1.8.1.2	<i>cysI, cysJ</i>	
Stérol déméthylase	1.14.13.70		ERG11
4-Hydroxy-3-méthylbut-2-ényl diphosphate réductase	1.17.1.2	<i>ispH</i>	
Flavodoxin réductase	1.18.1.2	<i>fpr</i>	

15 Les souches optimisées selon l'invention (*i.e.* capacité accrue de réduction du NADP<sup>+</sup>) comprennent également des modifications permettant de favoriser une ou plusieurs activité(s)

enzymatique(s) réduisant le NADP<sup>+</sup>, et en particulier, des modifications permettant d'imposer le flux de carbone via le cycle des pentoses phosphate, et/ou des modifications portant sur la spécificité de cofacteur d'au moins une enzyme, de telle sorte qu'elle utilise le NADP préférentiellement au NAD, son cofacteur habituel.

5 Les activités susceptibles d'être modifiées dans les souches optimisées selon l'invention (i.e. capacité accrue de réduction du NADP<sup>+</sup>) afin de favoriser une ou plusieurs activité(s) enzymatique(s) réduisant le NADP<sup>+</sup>, sont décrites ci-dessous :

Activités enzymatiques	Numéro EC	Gènes <i>E. coli</i>	Gènes <i>S. cerevisiae</i>
Phosphoglucose isomérase	5.3.1.9	<i>pgi</i>	PGI1
Phosphofructokinase	2.7.1.11	<i>pfkA, pfkB</i>	PFK1, PFK2
Glucose 6-phosphate déshydrogénase	1.1.1.49	<i>zwf</i>	ZWF1
6-Phosphogluconolactonase	3.1.1.31		SOL1, SOL2, SOL3, SOL4
6-Phosphogluconate déshydrogénase	1.1.1.44	<i>gnd</i>	GND1, GND2
6-Phosphogluconate déhydratase	4.2.1.12	<i>edd</i>	
Malate synthase	2.3.3.9	<i>aceB</i>	DAL7
Isocitrate lyase	4.1.3.1	<i>aceA</i>	ICL1
Isocitrate déshydrogénase	1.1.1.42	<i>icd</i>	IDP1, IDP2, IDP3
Isocitrate déshydrogénase kinase/phosphatase	2.7.1.116	<i>aceK</i>	
Dihydrolipoamide déshydrogénase	1.8.1.4	<i>lpd</i>	LPD1
Glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase	1.2.1.12	<i>gapA, gapC</i>	TDH1, TDH2, TDH3

Les activités enzymatiques susceptibles d'être modifiées dans les souches optimisées 10 selon l'invention sont définies principalement par l'emploi de la dénomination de la protéine ou du gène chez *E. coli* ou *S. cerevisiae*. Cependant, cet emploi a une signification plus générale selon l'invention et englobe les activités enzymatiques correspondantes chez d'autres microorganismes. En effet en utilisant les séquences des protéines et des gènes d'*E. coli* ou de *S. cerevisiae*, l'homme du métier est capable de déterminer les protéines et les gènes 15 équivalents dans d'autres microorganismes qu'*E. coli* ou *S. cerevisiae*.

Les moyens d'identification des séquences homologues et de leurs pourcentages d'homologie sont bien connus de l'homme du métier, comprenant notamment le programme BLAST qui peut être utilisé à partir du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres indiqués par défaut sur ce site. Les séquences obtenues peuvent alors être 20 exploitées (e.g. alignées) en utilisant par exemple les programmes CLUSTALW.

(<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ou MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), avec les paramètres indiqués par défaut sur ces sites.

Alternativement il est possible d'utiliser le programme CD-Search (<http://www.ncbi.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) qui permet d'identifier des domaines conservés dans les séquences protéiques d'*E. coli* ou de *S. cerevisiae*, et de rechercher des séquences d'autres microorganismes, présentant le ou les même(s) domaine(s). Les domaines conservés sont répertoriés dans la base de données CDD (Conserved domain database ; Marchler-Bauer A, Anderson JB, DeWeese-Scott C, Fedorova ND, Geer LY, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Jacobs AR, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Madej T, Marchler GH, Mazumder R, Nikolskaya AN, Panchenko AR, Rao BS, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Vasudevan S, Wang Y, Yamashita RA, Yin JJ, Bryant SH. CDD: a curated Entrez database of conserved domain alignments. *Nucleic Acids Research* 31:383-387 (2003)) qui regroupe les données de type PFAM ou COG.

Les PFAM (Protein FAMILIES database of alignments and hidden markov models ; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) représentent une large collection d'alignements de séquences protéiques. Chaque PFAM permet de visualiser des alignements multiples, de voir des domaines protéiques, d'évaluer la répartition entre les organismes, d'avoir accès à d'autres bases de données, de visualiser des structures connues de protéines.

Les COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) sont obtenus en comparant les séquences protéiques issus de 43 génomes complètement séquencés représentant 30 lignées phylogénétiques majeurs. Chaque COG est défini à partir d'au moins trois lignées ce qui permet ainsi d'identifier des domaines conservés anciens.

À partir des séquences consensus identifiées par ces différentes méthodes, il est possible de dessiner des sondes oligonucléotidiques dégénérées permettant de cloner le gène correspondant chez un autre microorganisme. Ces techniques de routine de biologie moléculaire sont bien connues dans l'art et sont décrites par exemple dans Sambrook *et al.* (1989 *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

Exemples de gènes codant pour des protéines analogues à la transhydrogénase soluble d'*E. coli* codée par le gène *udhA*:

Gènes	Microorganismes
<i>sth</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>
<i>udhA</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2
<i>sthA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01
<i>sth</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>sthA</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
<i>udhA</i>	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 3.O1
<i>sthA</i>	<i>Vibrio cholera</i>
<i>sthA</i>	<i>Yersinia pestis</i>

Exemples de gènes codant pour des protéines analogues à la quinone oxidoréductase d'*E. coli* codée par le gène *gor*:

Gènes	Microorganismes
<i>qor</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110
<i>qor</i>	<i>Brucella suis</i> 1330
CC3759	<i>Caulobacter crescentus</i>
mlI0505	<i>Mesorhizobium loti</i>
<i>qor</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37RV
<i>qor</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ZTA1	<i>S. cerevisiae</i>
SPCC285.01c	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>drgA</i>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803
<i>qorA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TTC0305	<i>Thermus thermophilus</i> HB8
<i>qor</i>	<i>Yersinia pestis</i> CO92

5 Les souches optimisées selon l'invention (*i.e.* capacité accrue de réduction du NADP<sup>+</sup>) comprennent la délétion d'au moins un gène codant pour une activité oxydant le NADPH, et en particulier, la délétion d'un gène codant pour une Quinone oxidoréductase (e.g. *qor*, ZTA1) et/ou d'un gène codant pour une activité Transhydrogénase soluble (e.g. *udhA*).

10 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les gènes *udhA* et *qor* sont tous deux délétés.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les souches optimisées selon l'invention comprennent également la délétion d'un ou plusieurs gène(s) codant pour les activités Phosphoglucose isomérase (e.g. *pgi*, PGI1) et/ou Phosphofructokinase (e.g. *pfkA*, PFK1).

5 Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, les souches optimisées selon l'invention comprennent également la modification d'un ou plusieurs gène(s) codant pour les activités Dihydrolipoamide déshydrogénase (e.g. *lpd*, LPD1) et/ou Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (e.g. *gapA*, TDH1), la modification consistant à modifier la préférence de l'enzyme au profit du NADP au lieu du NAD, son cofacteur habituel.

10 Les souches selon l'invention ayant la délétion des gènes codant pour les activités Phosphoglucose isomérase et/ou Phosphofructokinase sont plus particulièrement adaptées pour les procédés de biotransformation.

Pour augmenter davantage la quantité de NADPH disponible dans les microorganismes optimisés selon l'invention, il peut être également avantageux de surexprimer au moins un 15 gène codant pour une activité enzymatique parmi la Glucose 6-phosphate déshydrogénase (e.g. *zwf*, ZWF1), la 6-Phosphogluconolactonase (e.g. SOL1), la 6-Phosphogluconate déshydrogénase (e.g. *gnd*, GND1), l'Isocitrate déshydrogénase (e.g. *icd*, IDP1) et la Transhydrogénase membranaire (e.g. *pntA*), et/ou de déléter au moins un gène codant pour une 20 activité enzymatique parmi la 6-Phosphogluconate déhydratase (e.g. *edd*), la Malate synthase (e.g. *aceB*, DAL7), l'Isocitrate lyase (e.g. *aceA*, ICL1) et l'Isocitrate déshydrogénase kinase/phosphatase (e.g. *aceK*).

La présente invention a également pour objet un microorganisme optimisé pour la production de NADPH telle que définie ci-dessus et ci-après, lequel comprend également, un 25 ou plusieurs gènes codant pour des activités enzymatiques impliquées dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt, ainsi qu'un ou plusieurs gènes marqueurs de sélection.

Ces gènes peuvent être natifs de la souche optimisée selon l'invention ou encore introduits dans la souche optimisée selon l'invention par transformation avec un vecteur approprié, soit par intégration dans le génome du microorganisme ou encore par un vecteur 30 répliquatif, ledit vecteur approprié portant un ou plusieurs gènes codant pour lesdites enzymes

impliqués dans la biotransformation de ladite molécule d'intérêt et/ou lesdits marqueurs de sélection.

Ces gènes comprennent une séquence d'acide nucléique codant pour une enzyme impliquée dans la biotransformation de la molécule d'intérêt et/ou pour un marqueur de sélection, la séquence codante étant fusionnée à des séquences promotrices efficaces dans la cellule procaryote et/ou eucaryote choisie pour la biotransformation. Le vecteur (ou plasmide) peut-être un vecteur navette entre *E. coli* et un autre microorganisme.

Le choix de la souche optimisée pour le ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> sera déterminé en fonction du type de biotransformation (fermentation ou bioconversion), de la demande totale en NADPH de la voie de bioconversion considérée, de la nature de(s) source(s) carbonée(s), de la demande en flux de biomasse; ...

La délétion des gènes codant pour les activités Phosphoglucose isomérase et/ou Phosphofructokinase devrait s'imposer lorsque l'on n'est pas capable de maîtriser la répartition du flux de carbone entre la glycolyse et la voie des pentoses phosphate. La délétion des gènes codant pour la Phosphoglucose isomérase sera préférentiellement retenue pour les fermentations ou lorsque la demande en NADPH nécessite, au minimum, un flux de réduction de 2 moles de NADP<sup>+</sup> par mole de glucose importée. La délétion des gènes codant pour la Phosphofructokinase sera préférentiellement choisie pour les bioconversions ou lorsque la demande en NADPH nécessite, au minimum, un flux de réduction de 3-4 moles de NADP<sup>+</sup> par mole de glucose importée. La modification, telle que décrite ci-dessus et ci-après, des gènes codant pour les activités Dihydrolipoamide déshydrogénase et/ou Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase sera réalisée lorsque les biotransformations nécessiteront un flux de réduction, au minimum, supérieur à 3 moles de NADP<sup>+</sup> par mole de glucose importé et notamment, pour optimiser les souches *E. coli* Δ(*udhA, qor*) ou *E. coli* Δ(*udhA, qor, pgi*) ou *E. coli* Δ(*udhA, qor, pfkA, pfkB*). Les autres modifications citées, à savoir la surexpression d'au moins un gène codant pour une activité enzymatique parmi la Glucose 6-phosphate déshydrogénase, la 6-Phosphogluconolactonase, la 6-Phosphogluconate déshydrogénase, l'Isocitrate déshydrogénase et la Transhydrogénase membrinaire, et/ou la délétion d'au moins un gène codant pour une activité enzymatique parmi la 6-Phosphogluconate déshydratase, la Malate synthase, l'Isocitrate lyase et l'Isocitrate déshydrogénase kinase/phosphatase, pourront

être réalisées afin d'affiner l'optimisation du ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> aux besoins de la cellule et du procédé de biotransformation considéré.

La présente invention concerne également un procédé de préparation des souches optimisées selon l'invention telle que définie ci-dessus et ci-après, dans lequel on délete un gène pris parmi ceux codant pour les activités Quinone oxidoreductase et Transhydrogénase soluble, et le cas échéant on délete un gène pris parmi ceux codant pour les activités Glucose 6-phosphate déshydrogénase et 6-Phosphogluconolactonase, et/ou on modifie au moins un gène codant des enzymes à NAD, en particulier pour les activités Dihydrolipoamide déshydrogénase et Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, afin qu'elles utilisent préférentiellement le NADP, et le cas échéant on délete au moins un gène choisi parmi ceux codant pour les activités 6-Phosphogluconate déhydratase, Malate synthase, Isocitrate lyase et Isocitrate déshydrogénase kinase/phosphatase, ces délétions et modifications étant réalisées par un moyen approprié, et/ou on surexprime au moins un gène choisi parmi ceux codant pour les activités Glucose 6-phosphate déshydrogénase, 6-Phosphogluconolactonase, 6-Phosphogluconate déshydrogénase, Isocitrate déshydrogénase et Transhydrogénase membranaire, soit en transformant la souche avec un vecteur approprié permettant la surexpression, soit en modifiant la force du promoteur endogène contrôlant le gène à surexprimer.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le procédé de préparation des souches selon l'invention comprend également la transformation des souches optimisées avec au moins un vecteur approprié comprenant un ou plusieurs gène(s) codant une ou des enzyme(s) impliqués dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt, ainsi qu'un ou plusieurs gène(s) marqueur(s) de sélection.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation de ces souches optimisées selon l'invention pour les biotransformations NADPH-dépendantes permettant ainsi une amélioration du rendement de biotransformation par rapport à une souche non optimisée pour le NADPH.

Les biotransformations seront réalisées en utilisant des souches définies selon l'invention dans lesquelles seront exprimés des gènes codants pour des activités enzymatiques catalysant des réactions NADPH-dépendantes. L'homme du métier saura aisément identifier de telles enzymes, on citera pour exemples et sans que cette liste soit limitative les enzymes

suivantes : EC 1.1.1.10 L-xylulose réductase, EC 1.1.1.21 méthylglyoxal réductase, EC 1.1.1.51 3(or 17) $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase, EC 1.1.1.54 allyl-alcohol déshydrogenase, EC 1.1.1.80 isopropanol déshydrogénase, EC 1.1.1.134 dTDP-6-déoxy-L-talose 4-déshydrogénase, EC 1.1.1.149 20 $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase, EC 1.1.1.151 5 21-hydroxystéroïde déshydrogénase, EC 1.1.1.189 prostaglandine-E<sub>2</sub> 9-réductase, EC 1.1.1.191 indole-3-acétaldehyde réductase EC 1.1.1.207 (-)-menthol déshydrogénase, EC 1.1.1.234 flavanone 4-réductase, EC 1.2.1.50 long-chain-fatty-acyl-CoA réductase, EC 1.3.1.4 cortisone  $\alpha$ -réductase, EC 1.3.1.23 cholesténone 5 $\beta$ -réductase, EC 1.3.1.70  $\Delta^{14}$ -stérol réductase, EC 1.4.1.12 2,4-diaminopentanoate déshydrogénase, EC 1.5.1.10 saccharopine 10 déshydrogénase, L-glutamate-forming, EC 1.7.1.6 azobenzène réductase, EC 1.8.1.5 2-oxopropyl-CoM réductase (carboxylating), EC 1.10.1.1 *trans*-acénaphthène-1,2-diol déshydrogénase, EC 1.14.13.7 phénol 2-monooxygénase, EC 1.14.13.12 benzoate 4-monooxygénase, EC 1.14.13.26 phosphatidylcholine 12-monooxygénase, EC 1.14.13.64 4-hydroxybenzoate 1-hydroxylase, EC 1.14.13.70 stérol 14-déméthylase, EC 1.16.1.5 15 aquacobalamine réductase, EC 1.17.1.1 CDP-4-déhydro-6-déoxyglucose réductase, EC 1.18.1.2 ferredoxine-NADP réductase.

L'invention concerne aussi un procédé de production d'une molécule d'intérêt dont au moins une des réactions de la voie de biosynthèse est NADPH-dépendante, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 20      a) mise en culture des microorganismes optimisés selon l'invention dans un milieu de culture approprié favorisant leur croissance et comprenant les substances nécessaires pour la réalisation de la biotransformation par fermentation ou biotransformation, à l'exception du NADPH, et
- b) extraction de la molécule d'intérêt du milieu et le cas échéant purification.
- 25      De manière préférentielle, la molécule d'intérêt est choisie parmi les acides aminés, les vitamines, les stérols, les flavonoïdes, les acides gras, les acides organiques, les polyols, les hydroxyesters. Pour les acides aminés ou leurs précurseurs on citera en particulier la lysine, la méthionine, la thréonine, la proline, l'acide glutamique, l'homosérine, l'isoleucine, la valine. Pour les vitamines ou leurs précurseurs on citera notamment le pantoate, le trans-neurosporène, la phylloquinone, les tocophérols. Pour les stérols on citera notamment le squalène, le cholestérol, la testostérone, la progesterone, la cortisone. Pour les flavonoïdes on

citera notamment la frambinone et la vestitone. Pour les acides organiques on citera l'acide coumarique, l'acide 3-hydroxypropionique. Pour les polyols on citera le sorbitol, le xylitol, le glycérol. Pour les hydroxyesters on citera l'éthyl-3-hydroxybutyrate, l'éthyl-4-chloro-3-hydroxybutyrate.

5 Dans le cas d'une bioconversion, le procédé comprend aussi l'ajout du substrat à « convertir » dans le milieu de culture approprié.

Le milieu de culture cité à l'étape b) du procédé selon l'invention définie ci-dessus comprend au moins un carbohydrate assimilable choisi parmi différents sucres assimilables, tels le glucose, le galactose, le saccharose, le lactose, ou les mélasses, ou les sous-produits de 10 ces sucres. Une source de carbone simple tout particulièrement préférée est le glucose. Une autre source de carbone simple préférée est le saccharose. Le milieu de culture peut en outre contenir une ou plusieurs substances (e.g. acides aminés, vitamines, sels minéraux, ...) favorisant la croissance du microorganisme et/ou la production de la molécule d'intérêt. En particulier, le milieu minéral de culture pour *E. coli* pourra ainsi être de composition identique 15 ou similaire à un milieu M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128), un milieu M63 (Miller, 1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou un milieu tel que défini par Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96).

20 La définition des conditions de biotransformation est du ressort de l'homme du métier. On fermente notamment les microorganismes à une température comprise entre 20°C et 55°C, de préférence entre 25°C et 40°C, plus particulièrement d'environ 30°C pour *S. cerevisiae* et d'environ 37°C pour *E. coli*.

25 Les exemples ne sont donnés qu'à titre d'illustration de l'invention et ne limitent en aucun le mode de réalisation ni la portée de l'invention.

**Exemple 1 : Calcul des rendements optimaux théoriques de bioconversion de l'éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate**

**a) bioconversion avec *E. coli***

30 Des modélisations prédictives sont réalisées en utilisant l'algorithme MetOpt®-Coli, un modèle stœchiométrique développé par la société METabolic EXplorer, qui permet de

définir 1) le rendement maximal de production en éthyl-3-hydroxybutyrate à partir de l'éthylacétoacétate 2) la meilleure distribution de flux à partir du glucose pour assurer les besoins de croissance et d'équilibres redox nécessaires pour le développement de la cellule et l'atteinte du rendement maximal de bioconversion.

5 Les paramètres imposés au modèle sont notamment 1) un flux d'import de glucose à 3 mmol.g<sup>-1.h<sup>-1</sup>, 2) un taux de croissance variable de 0, 0.15 et 0.25 h<sup>-1</sup>, 3) un flux de la transhydrogénase membranaire (*pntAB*) variable et inférieur ou égal à 1 mmol.g<sup>-1.h<sup>-1</sup>. La valeur limite de flux de la transhydrogénase membranaire est déterminée à partir de la littérature (Hanson, 1979 ; Anderlund *et al.*, 1999 ; Emmerling *et al.*, 2002); 4) le flux de 10 maintenance a été limité entre 5 et 22 mmol.g<sup>-1.h<sup>-1</sup>.</sup></sup></sup>

Dans tous les cas le modèle suggère la délétion des gènes *udhA* et *qor*. En pratique toutefois, la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor)$ ] ne permettra pas d'obtenir un rendement équivalent au rendement optimum théorique, car il sera difficile de maintenir la répartition adéquate de flux de carbone entre la voie des pentoses phosphate et celle de la glycolyse, cette répartition 15 étant variable avec le taux de croissance. En pratique, on préférera donc utiliser les souches *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$ ] ou [ $\Delta(udhA, qor, pgi)$ ], le choix entre ces deux souches étant fonction du taux de croissance de la souche lors du procédé de bioconversion.

Les rendements optimaux théoriques de bioconversion de l'éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate ont été calculés pour différentes souches de *E. coli* optimisées selon 20 l'invention :

	$\mu = 0$	$\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
$\Delta(udhA, qor, pgi)$	1,82	1,74	1,22
$\Delta(udhA, qor, pgi)$ gapA-NADP dépendant	4,29	3,64	2,43
$\Delta(udhA, qor, pgi)$ <i>lpd</i> -NADP dépendant	5,67	3,46	1,99
$\Delta(udhA, qor, pgi)$ gapA-NADP dépendant <i>lpd</i> -NADP dépendant	6,86	4,96	3,33
$\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$	6,76	4,65	0,19
$\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$ gapA-NADP dépendant	8,16	5,54	1,02
$\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$ <i>lpd</i> -NADP dépendant	8,33	5,60	1,77
$\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$ gapA-NADP dépendant <i>lpd</i> - NADP dépendant	9,33	6,38	2,60

**Rendements optimaux théoriques de bioconversion de l'éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate (mol par mol de glucose) par des souches d'*E. coli* optimisées dans leur capacité de réduction du NADP<sup>+</sup>**

Afin d'améliorer encore le rendement optimal théorique des souches optimisées selon 5 l'invention, des modifications supplémentaires peuvent être prises en compte, telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB* et *aceK*.

**b) bioconversion avec *S. cerevisiae***

Les modélisations prédictives sont réalisées en utilisant l'algorithme MetOpt®-Scere, 10 un modèle stœchiométrique développé par la société, qui permet de définir 1) le rendement maximal de production en éthyl-3-hydroxybutyrate à partir de l'éthylacétoacétate 2) la meilleure distribution de flux à partir du glucose pour assurer les besoins de croissance et d'équilibres redox nécessaire pour le développement de la cellule et l'atteinte du rendement maximal de bioconversion.

15 Les paramètres imposés au modèle sont notamment 1) un flux d'import de glucose à 3 mmol.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, 2) un taux de croissance variable de 0, 0.15 et 0.25 h<sup>-1</sup>, 3) un flux de maintenance inférieur ou égal à 22 mmol.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>; 4) les réactions des aldéhydes déshydrogénases (ALD2, ALD3, ALD6) sont irréversibles et imposées dans le sens acétate + NAD(P)H → acétaldehyde + NAD(P); 5) la levure ne possède pas d'activités équivalentes à 20 *udhA* ou *pntA,B*.

Le modèle permet de prendre en compte la compartimentation mitochondriale et peroxisomale.

Dans tous les cas, le modèle suggère la délétion d'un gène codant pour une enzyme oxydant le NADPH et en particulier, du gène ZTA1. En pratique toutefois, la souche *S. cerevisiae* [ΔZTA1] ne permettra pas d'obtenir un rendement équivalent au rendement optimum théorique, car il sera difficile de maintenir la répartition adéquate de flux de carbone entre la voie des pentoses phosphate et celle de la glycolyse, cette répartition étant variable avec le taux de croissance. En pratique, on préférera donc utiliser les souches *S. cerevisiae* [Δ(ZTA1, PFK1, PFK2)] ou [Δ(ZTA1, PGI1)], le choix entre ces deux souches étant fonction 25 du taux de croissance de la souche lors du procédé de bioconversion.

Les rendements optimaux théoriques de bioconversion de l' éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate ont été calculés pour différentes souches de *S. cerevisiae* optimisées selon l'invention :

	$\mu = 0$	$\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
$\Delta(\text{ZTA1}, \text{PGI1})$	2,42	2,00	1,73
$\Delta(\text{ZTA1}, \text{PGI1})$ TDH1,2,3-NADP dépendant	4,22	3,50	3,03
$\Delta(\text{ZTA1}, \text{PGI1})$ LPD1-NADP dépendant	4,08	3,29	2,77
$\Delta(\text{ZTA1}, \text{PGI1})$ TDH1,2,3-NADP dépendant LPD1-NADP dépendant	6,17	5,01	4,23
$\Delta(\text{ZTA1}, \text{PFK1}, \text{PFK2})$	12,00	8,18	5,64
$\Delta(\text{ZTA1}, \text{PFK1}, \text{PFK2})$ TDH1,2,3-NADP dépendant	12,00	9,11	7,19
$\Delta(\text{ZTA1}, \text{PFK1}, \text{PFK2})$ LPD1-NADP dépendant	12,00	8,44	6,06
$\Delta(\text{ZTA1}, \text{PFK1}, \text{PFK2})$ TDH1,2,3-NADP dépendant LPD1-NADP dépendant	12,00	9,28	7,46

5 Rendements optimaux théoriques de bioconversion de l'éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate (mol par mol de glucose) par des souches de *S. cerevisiae* optimisées dans leur capacité de réduction du NADP<sup>+</sup>

Afin d'améliorer encore le rendement optimal théorique des souches optimisées selon  
10 l'invention, des modifications supplémentaires peuvent être prises en compte, telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi ZWF, SOL1, SOL2, SOL3, SOL4, GND1, GND2, IDP1, IDP2 et IDP3 et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi ICL1, DAL7.

Exemple 2 : Construction de la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, egor)$ ]

15 L'inactivation du gène *udhA* est réalisée par recombinaison homologue d'après la technique décrite par Datsenko et Wanner (One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97 : 6640-6645).

Cette technique consiste à insérer une cassette de résistance à un antibiotique (chloramphénicol) tout en déletant la majeure partie du gène concerné. Pour cela on synthétise  
20 une paire d'oligonucléotides, chacun étant constitués de 100pb dont 80pb (minuscules) sont

homologues avec le gène à déléter (e.g. *udhA*) et 20pb (majuscules) sont homologues avec la cassette de résistance au chloramphénicol :

DudhAF

ggtcgcgcgtcgacgttatcgagcgtaatcaaaatgtggcggcggtgcacccactggggcaccatcccgctgaaagcCATAT

5 GAATATCCTCCTAG

DudhAR

CccagaatcttttgttcccgtatggaaacaaaatttcagcgtgccacgttcatgccgacgatttgcgctgcccagTGTAGGC  
TGGAGCTGCTTCG

La cassette antibiotique portée par le plasmide pKD3 est amplifiée par PCR en utilisant 10 les oligonucléotides DudhAF et DudhAR. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche *E. coli* [pKD46], qui porte le gène codant la Red recombinase, enzyme catalysant la recombinaison homologue. Les transformants résistants au chloramphénicol sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR en utilisant les oligonucléotides UdhAF et UdhAR :

15 UdhAF

Gccgcgtcaggatatagccagataatgac

UdhAR

Gcgggatcactttactgccagcgctggctg

La cassette de résistance au chloramphénicol est ensuite éliminée. Pour cela, le 20 plasmide pCP20 porteur de la recombinase FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol, est introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Puis, après une série de cultures à 42°C, la perte de la cassette de résistance à l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides UdhAF et UdhAR.

L'inactivation du gène *qor* est réalisée selon la même technique en utilisant les 25 oligonucléotides suivants :

DqorF

ggggccccggaaagtacttcaagccgttagagttcactcctggccatccggcgagaatgaaatccaggtcgaaaataaagcCATAT

GAATATCCTCCTAG

DqorR

30 cgcccggttccagaatctcatgcgcacgctgcgcattcagcgataattctgctgctggcgacatgaccattaaTGTAGGC  
TGGAGCTGCTTCG

QorF

Cgccaacaccgactgctccgcttcgatcg

QorR

cagcgttatgaccgctggcgttactaaggg

5 Pour des raisons pratiques, il peut être intéressant de déléter les deux gènes simultanément. Pour cela chaque gène est remplacé par une cassette de résistance à un antibiotique différent (par exemple chloramphénicol pour *udhA* et kanamycine pour *qor*).

La souche obtenue est donc *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor)$ ].

10 Exemple 3 : Construction du plasmide pSK-PgapA-GRE2p, introduction dans la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor)$ ] et biotransformation de l'éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate

Le plasmide pSK-PgapA est construit par insertion du promoteur *gapA* dans le vecteur pBluescript-SK (pSK). Pour cela, le promoteur *gapA* d'*E. coli* est amplifié avec la polymerase 15 *Pwo* à partir de l'ADN chromosomique.

Le produit PCR obtenu est ensuite digéré par l'enzyme de restriction *HindIII* et ligaturé au vecteur pSK digéré par l'enzyme de restriction *HindIII* et déphosphorylé pour donner le plasmide pSK-PgapA. Le vecteur pSK porte une origine de réPLICATION pour *E. coli* et un gène de résistance à l'ampicilline.

20 Le plasmide pSK-PgapA est alors introduit dans la souche *E. coli* DH5 $\alpha$  pour vérification de la construction. Le séquençage du promoteur *gapA* du plasmide pSK-PgapA avec l'oligonucléotide universel M13 forward est ensuite réalisé pour confirmer la construction.

Le plasmide pSK-PgapA-GRE2p est construit par insertion du gène GRE2p dans le 25 plasmide pSK-PgapA. Pour cela, le gène GRE2p de *Saccharomyces cerevisiae* est amplifié avec la polymerase *Pwo* à partir de l'ADN chromosomique en utilisant les oligonucléotides suivants :

Ome119\_GRE2F (NdeI)

Acgtacgtggcatatgtcagtttcgtttcaggtgctaacggg

30 Ome120\_GRE2R (PstI)

Acgtacctgcagttatattctgccctcaaatttaaaatttggg

Le produit PCR obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction *NdeI* - *PstI* et ligaturé au vecteur pSK-PgapA digéré par les enzymes de restriction *NdeI* - *PstI* et déphosphorylé pour donner le plasmide pSK-PgapA-GRE2p. Le plasmide pSK-PgapA porte une origine de réPLICATION pour *E. coli* et un gène de résistance à l'ampicilline.

5 Le plasmide pSK-PgapA-GRE2p est alors introduit dans la souche *E. coli* DH5 $\alpha$  pour vérification de la construction. Le séquençage du gène GRE2p du plasmide pSK-PgapA-GRE2p avec les oligonucléotides universels M13 reverse et M13 forward est ensuite réalisé pour confirmer la construction.

Le plasmide validé est alors introduit dans la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor)$ ] (exemple 10 2) par électroporation.

La souche obtenue *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor)$ ] pSK-PgapA-GRE2p] est alors cultivée en milieu minimum contenant du glucose et de l'éthylacétoacétate. Une souche d'*E. coli* [pSK-PgapA-GRE2p] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- 15 - l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion,
- la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate produit dans le milieu extracellulaire,
  - la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate accumulé dans les cellules,
  - la productivité en éthyl-3-hydroxybutyrate,
  - le rendement glucose/éthyl-3-hydroxybutyrate.

20 On pourra observer que la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor)$ ] pSK-PgapA-GRE2p] présente un rendement de production d'éthyl-3-hydroxybutyrate accru par rapport à la souche non optimisée.

**Exemple 4 : Construction de la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi$ ] pSK-PgapA-GRE2p] et 25 biotransformation de l'éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate**

L'inactivation du gène *pgi* est conduite dans la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor)$ ] (exemple 2) en utilisant la technique décrite dans l'exemple 2, et les oligonucléotides suivants :

D<sub>pgi</sub>F

ccaaacgcagaccgctgcctggcaggcactacagaaacacttcgatgaaatgaaagacgttacgatcgccgatctttgcTGTAGG

30 CTGGAGCTGCTTCG

D<sub>pgi</sub>R

gcccacgttatagcggttaatcagaccattggcgagctatcggtgctgctgatttttatcatcttcagctctgCATATGAAT  
ATCCTCCTTAG

pgiF

gcggggcggttgtcaacgatgggtcatgc

5 pgiR

cgtatgattccgttaaattacagacaag

La construction est réalisée en milieu riche (e.g. LB). On introduit alors dans la souche obtenue le plasmide pSK-PgapA-GRE2p (exemple 3) par électroporation, et la souche résultante *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi)$  pSK-PgapA-GRE2p] est sélectionnée sur milieu riche.

10 La souche obtenue est alors cultivée en milieu minimum contenant du glucose et de l'éthylacétoacétate. Une souche d'*E. coli* [pSK-PgapA-GRE2p] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion,
- la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate produit dans le milieu extracellulaire,
- la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate accumulé dans les cellules,
- la productivité en éthyl-3-hydroxybutyrate,
- le rendement glucose/éthyl-3-hydroxybutyrate.

On pourra observer que la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi)$  pSK-PgapA-GRE2p] présente un rendement de production d'éthyl-3-hydroxybutyrate accru par rapport à la souche non optimisée.

	mol <sub>EHB</sub> /mol <sub>Glucose</sub>
MG1655 pSK-PgapA-GRE2p	0,75
MG1655 $\Delta(udhA, qor, pgi)$ pSK-PgapA-GRE2p	2,12

Exemple 5 : Construction de la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi, edd)$  pSK-PgapA-GRE2p] et biotransformation de l'éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate

25 L'inactivation du gène *edd* est conduite dans la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi)$ ] (exemple 4) en utilisant la technique décrite dans l'exemple 2, et les oligonucléotides suivants :

DeddF (1932582-1932499)

CgcgcgagactcgctctgttatctggccggatagaacaaggaaaacttcgaccgttcatcggttcgcagtggcatgcggTGTA  
GGCTGGAGCTGCTTCG

DeddR (1930866-1930943)

cgcaaggcgctgaataattcacgtcctgttcccacg cogtacgcgcgtcaggtcaggaatgtgcggttcgcgagcagccCATATG

5 AATATCCTCCTTAG

EddF (1932996-1932968)

Ggtagactccattactgaggcggtggcgc

EddR (1930439-1930462)

Ccccggaatcagaggaatagtccc

10 La construction est réalisée en milieu riche (e.g. LB). On introduit alors dans la souche obtenue *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi, edd)$ ] le plasmide pSK-PgapA-GRE2p (exemple 3) par électroporation, et la souche résultante *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi, edd)$  pSK-PgapA-GRE2p] est sélectionnée sur milieu riche.

La souche obtenue *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi, edd)$  pSK-PgapA-GRE2p] est alors 15 cultivée en milieu minimum contenant du glucose et de l'éthylacétoacétate. Une souche *E. coli* [pSK-PgapA-GRE2p] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion,
- la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate produit dans le milieu extracellulaire,
- 20 - la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate accumulé dans les cellules,
- la productivité en éthyl-3-hydroxybutyrate,
- le rendement glucose/éthyl-3-hydroxybutyrate.

On pourra observer que la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi, edd)$  pSK-PgapA-GRE2p] présente un rendement de production d'éthyl-3-hydroxybutyrate accru par rapport à la souche 25 non optimisée.

**Exemple 6 : Construction de la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$  pSK-PgapA-GRE2p] et biotransformation de l'éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate**

L'inactivation des gènes *pfkA* et *pfkB* est conduite dans la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor)$ ] (exemple 2) en utilisant la technique décrite dans l'exemple 2, et les oligonucléotides suivants :

**DpfkAF**

ggt gtg ttg aca agc ggc ggt gat gcg cca ggc atg aac gcc gca att cgc ggg gtt gtt cgt tct gcg ctg  
aca gaa ggTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

**DpfkAR**

5 TtcgcgcagtccagccagtcaccttgaacggacgcttcatgtttcgatagcgatcgatgtcgtaaccagctgCATATG  
AATATCCTCCTTAG

**PfkAF**

Cgcacgcggcagtcaaggccgaccgc

**PfkAR**

10 ccctacgccccacttgttcatgccccg

DpfkBF (1804421-1804499)

gcgcctctcgatagcgcaacaatttacccgcaaatttatcccgaaggaaaactgcgcgttaccgcaccgggttcgTGTAGG  
CTGGAGCTGCTTCG

DpfkBR (1805320-1805241)

15 gcgggaaaggtaagcgtaattttcgatcgatggagcacagacgtgtccctgattgagtgtggctgcactccCATATG  
AATATCCTCCTTAG

PfkBF (1803996-1804025)

tggcaggatcatccatgacagtaaaacgg

PfkBR (1805657-1805632)

20 gccgggtgcacttggtaagccccg

La construction est réalisée en milieu riche (e.g. LB). On introduit alors dans la souche obtenue *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$ ] le plasmide pSK-PgapA-GRE2p (exemple 3) par électroporation, et la souche résultante *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$  pSK-PgapA-GRE2p] est sélectionnée sur milieu riche.

25 La souche obtenue *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$  pSK-PgapA-GRE2p] est alors cultivée en milieu minimum contenant du glucose et de l'éthylacétoacétate. Une souche *E. coli* [pSK-PgapA-GRE2p] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion,
- la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate produit dans le milieu extracellulaire,
- la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate accumulé dans les cellules,

- la productivité en éthyl-3-hydroxybutyrate,
- le rendement glucose/éthyl-3-hydroxybutyrate.

On pourra observer que la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$  pSK-PgapA-GRE2p] présente un rendement de production d'éthyl-3-hydroxybutyrate accru par rapport à 5 la souche non optimisée.

	mol <sub>EHB</sub> /mol <sub>Glucose</sub>
MG1655 pSK-PgapA-GRE2p	0,75
MG1655 $\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$ pSK-PgapA-GRE2p	3,46

Exemple 7 : Construction de la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi, lpd)$  p $lpd^*$ , pSK-PgapA-GRE2p] et biotransformation de l'éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate

Le gène *lpd* codant la dihydrolipoamide déshydrogénase NAD-dépendante, impliquée 10 dans le complexe multienzymatique pyruvate déshydrogénase, est déleté en utilisant la technique décrite dans l'exemple 2 sauf que la souche initiale est la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi)$ ] décrite dans l'exemple 4 au lieu d'être une souche sauvage. La construction et la sélection de la souche modifiée est réalisée en milieu riche (e.g. LB). La souche obtenue est *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi, lpd)$ ].

15 Par ailleurs on construit le plasmide p-*lpd*\* qui permet la surexpression d'une dihydrolipoamide déshydrogénase NADP-dépendante. Il existe différentes possibilités pour modifier la spécificité de cofacteur d'une enzyme. Par exemple Bocanegra *et al.* (1993) divulguent une méthode pour créer une dihydrolipoamide déshydrogénase NADP-dépendante.

20 Les plasmides p-*lpd*\* et pSK-PgapA-GRE2p sont alors introduit par électroporation dans la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi, lpd)$ ], alternativement, on peut choisir de cloner *lpd*\* sur pSK-PgapA-GRE2p ; on obtiendrait alors le plasmide pSK-PgapA-GRE2p-*lpd*\* que l'on introduirait par électroporation dans la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi, lpd)$ ]. La construction et la sélection de la souche modifiée est réalisée en milieu riche (e.g. LB).

25 La souche obtenue *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi, lpd)$  pSK-PgapA-GRE2p, p-*lpd*\*] est alors cultivée en milieu minimum contenant du glucose et de l'éthylacétoacétate. Une souche *E. coli* [pSK-PgapA-GRE2p] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion,
- la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate produit dans le milieu extracellulaire,
- la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate accumulé dans les cellules,
- la productivité en éthyl-3-hydroxybutyrate,
- 5 - le rendement glucose/éthyl-3-hydroxybutyrate.

On pourra observer que la souche *E. coli* [ $\Delta(udhA, qor, pgi, lpd)$  pSK-PgapA-GRE2p, p-lpd\*]) présente un rendement de production d'éthyl-3-hydroxybutyrate accru par rapport à la souche non optimisée.

10

#### Exemple 8 : Construction du plasmide pRSGK-GRE2p

Le plasmide pYGK est construit par insertion du promoteur *Ppgk*, du site de multicolonage et du terminateur *cycl* du vecteur pYPG2 dans le vecteur pBluescript-SK (pSK). Pour cela, le promoteur *Ppgk*, le site de multicolonage et le terminateur *cycl* sont amplifiés avec la polymérase *Pfu Turbo* à partir du vecteur pYPG2. Le produit PCR obtenu est ensuite 15 digéré par les enzymes de restriction *SacII* - *NotI* et ligaturé au vecteur pSK digéré par les enzymes de restriction *ApaI* - *SmaI*, ligaturé puis digéré par les enzymes de restriction *NotI* - *SacII* et déphosphorylé pour donner le plasmide pYGK.

Le plasmide pYGK est alors introduit dans la souche *E. coli* DH5 $\alpha$  pour vérification de la construction. Le séquençage du promoteur *Ppgk*, du site de multicolonage et du terminateur 20 *cycl* du plasmide pYGK avec les oligonucléotides universels M13 reverse et M13 forward est ensuite réalisé pour confirmer la construction.

Le plasmide pYGK-GRE2p est ensuite construit par insertion du gène GRE2p dans le plasmide pYGK. Pour cela, le gène GRE2p de *Saccharomyces cerevisiae* est amplifié avec la polymérase *Pwo* à partir de l'ADN chromosomique, en utilisant les oligonucléotides suivants :

25 Ome376\_Gre2 pYGK F (*SmaI*)

Acgtacgtccccggaaaaatgtcagtttcgtttcaggtgc

Ome377\_Gre2 pYGK R (*ApaI*)

ACGTACGGGCCCTATATTCTGCCCTCAAATTTAAAATTTGGG

Le produit PCR obtenu est ensuite digéré par les enzymes de restriction *ApaI* - *SmaI* et 30 ligaturé au vecteur pYGK digéré par les enzymes de restriction *ApaI* - *SmaI* et déphosphorylé pour donner le plasmide pYGK-GRE2p.

Le plasmide pYGK-GRE2p est alors introduit dans la souche *E. coli* DH5 $\alpha$  pour vérification de la construction. Le séquençage du gène GRE2p du plasmide pYGK-GRE2p avec les oligonucléotides universels M13 reverse et M13 forward est ensuite réalisé pour confirmer la construction.

5 Le plasmide pRSGK-GRE2p est finalement obtenu par digestion des plasmides pYGK-GRE2p et pRS426 avec les enzymes de restriction *NotI - SacII* puis ligation.

**Exemple 9 : Construction de la souche *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1) pRSGK-GRE2p] et biotransformation de l'éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate**

10 L'inactivation du gène ZTA1 est réalisée en insérant un marqueur (résistance à un antibiotique, auxotrophie) tout en déletant la majeure partie du gène concerné. La technique utilisée est décrite par Brachmann *et al.* (Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C : a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications, *Yeast*, 1998, 14: 115-32). On peut aussi utiliser la technique 15 décrite par Wach *et al.* (New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 1994, 10 : 1793-1808).

Dans tous les cas on obtient une souche finale *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1)], dans laquelle le plasmide pRSGK-GRE2p (exemple 8) est alors introduit.

20 Alternative, on peut aussi choisir d'introduire le plasmide pRSGK-GRE2p dans une souche  $\Delta$ (ZTA1) disponible, par exemple la souche EUROSCARF Y33183 (génotype : BY4743; Mat a/ $\alpha$ ; his3D1/his3D1; leu2D0/leu2D0; lys2D0/LYS2; MET15/met15D0; ura3D0/ura3D0; YBR046c::kanMX4/YBR046c::kanMX4). Il est alors possible après sporulation de récupérer une souche homozygote *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1) pRSGK-GRE2p].

25 La souche obtenue *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1) pRSGK-GRE2p] est ensuite cultivée en milieu minimum contenant du glucose et de l'éthylacétoacétate.

La souche témoin *S. cerevisiae* [pRSGK-GRE2p] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion,  
30 - la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate produit dans le milieu extracellulaire,  
- la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate accumulé dans les cellules,

- la productivité en éthyl-3-hydroxybutyrate,
- le rendement glucose/éthyl-3-hydroxybutyrate.

On pourra observer que la souche *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1) pRSGK-GRE2p] présente un rendement de production d'éthyl-3-hydroxybutyrate accru par rapport à la souche non optimisée.

**Exemple 10 : Construction de la souche *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1, PGI1) pRSGK-GRE2p] et biotransformation de l'éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate**

L'inactivation du gène PGI1 est réalisée dans la souche *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1) pRSGK-GRE2p] en utilisant la technique décrite dans l'exemple 9, et les oligonucléotides suivants :

Dpgi1F

CCAACGCAGACCGCTGCCTGGCAGGCACATACAGAAACACTTCGATGAAATGAAA  
GACGTTACGATCGCCGATCTTTTGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG

Dpgi1R

GCGCCACGCTTATAGCGGTTAACATCAGACCATTGGTCGAGCTATCGTGGCTGCTGA  
TTTCCTTATCATCTTCAGCTCTGCATATGAATATCCTCCTTAG

Pgi1F

GCAGGGCGGTTGTCAACGATGGGGTCATGC

Pgi1R

CGGTATGATTCCGTTAAATTACAGACAAG

Alternativement il est possible d'utiliser une souche  $\Delta$ (PGI1) disponible, par exemple la souche EUROSCARF Y23336 (Mat  $\alpha/a$ ; his3D1/his3D1; leu2D0/leu2D0; lys2D0/LYS2; MET15/met15D0; ura3D0/ura3D0; YBR196c::kanMX4/YBR196c). La souche est alors transformée par le plasmide pRSGK-GRE2p (exemple 8) puis la délétion du gène ZTA1 est réalisée en utilisant la technique décrite dans l'exemple 9.

La souche obtenue *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1, PGI1) pRSGK-GRE2p] est alors cultivée en milieu minimum contenant du glucose et de l'éthylacétoacétate.

La souche témoin *S. cerevisiae* [pRSGK-GRE2p] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion,
- la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate produit dans le milieu extracellulaire,
- la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate accumulé dans les cellules,
- la productivité en éthyl-3-hydroxybutyrate,
- 5 - le rendement glucose/éthyl-3-hydroxybutyrate.

On pourra observer que la souche *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1, PGI1) pRSGK-GRE2p] présente un rendement de production d'éthyl-3-hydroxybutyrate accru par rapport à la souche non optimisée.

10 **Exemple 11 : Construction de la souche *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1, PFK1, PFK2) pRSGK-GRE2p] et biotransformation de l'éthylacétoacétate en éthyl-3-hydroxybutyrate**

Les gènes PFK1 et PFK2 sont déletés dans la souche *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1)] en utilisant la technique décrite dans l'exemple 9, et les oligonucléotides suivants :

Dpfk1F

15 ATGCAATCTCAAGATTGATGCTACGGTGTGCATTGAGATCTATCATCACAAATGA  
TGAAAAGCTTCGTACGCTGCAGGTCG

Dpfk1R

TTTGTTCAGCGGCTAAAGCGGCTACCTCAGCTCTCAACTTAATCTACCGGACA  
GGATGGGCCACTAGTGGATCTGATATC

20 Pfk1 int F

GCTTTCTTAGAAGCTACCTCCG

Pfk1 int R

GAACCGACAAGACCAACAAATGG

Pfk2 int F

25 CAGTTGTACACTTGGACCC

Pfk2 int R

GATCAGCACCAAGTCAAAGAAC

La souche est alors transformée par le plasmide pRSGK-GRE2p (exemple 8).

La souche obtenue *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1, PFK1, PFK2) pRSGK-GRE2p] est alors 30 cultivée en milieu minimum contenant du glucose et de l'éthylacétoacétate.

La souche témoin *S. cerevisiae* [pRSGK-GRE2p] est cultivée dans les mêmes conditions.

Lorsque les cultures sont achevées on compare :

- l'évolution de la biomasse de chaque souche pendant la phase de bioconversion,
- 5 - la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate produit dans le milieu extracellulaire,
- la quantité d'éthyl-3-hydroxybutyrate accumulé dans les cellules,
- la productivité en éthyl-3-hydroxybutyrate,
- le rendement glucose/éthyl-3-hydroxybutyrate.

On pourra observer que la souche *S. cerevisiae* [ $\Delta$ (ZTA1, PFK1, PFK2) pRSGK-  
10 GRE2p] présente un rendement de production d'éthyl-3-hydroxybutyrate accru par rapport à la souche non optimisée.

	mol <sub>EHB</sub> /mol <sub>Glucose</sub>
<i>S. cerevisiae</i> [pRSGK-GRE2p]	en cours
<i>S. cerevisiae</i> [ $\Delta$ (ZTA1, PFK1, PFK2) pRSGK-GRE2p]	en cours

**Exemple 12 : Comparaison entre valeurs expérimentales et prédictions par le modèle métabolique pour l'optimisation de la production d'éthyl-3-hydroxybutyrate par**

15

**Escherichia coli**

On pourra observer une bonne corrélation entre les modélisations prédictives (exemple 1) et les réalisations expérimentales décrites dans les exemples 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 et 11.

Les exemples 1 à 11 ci-dessus sont des applications particulières du brevet et n'en limitent pas l'utilisation. L'homme de l'art saura aisément adapter ces exemples pour la 20 biotransformation de molécules ayant une synthèse NADPH-dépendante. L'algorithme MetOpt® et la stratégie d'optimisation d'un procédé de bioconversion NADPH-dépendant via l'optimisation du ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> est validé ; cela nous permet en outre de revendiquer une application élargie à toutes les biotransformations NADPH dépendantes, qui pourront être modélisées et prévues par MetOpt® ou l'un de ses dérivés, en utilisant *E. coli*, *S. cerevisiae* ou 25 tout autre microorganisme.

**Exemple 13 : Calcul des rendements optimaux théoriques dans le cadre de procédés de fermentation chez *E. coli***

L'exemple 12 montre que les modèles MetOpt® développés par la société sont applicables aux bioconversions et devraient plus généralement s'appliquer aux biotransformations telles que les fermentations.

A titre d'exemples, le modèle MetOpt®-Coli est appliqué à la production de cystéine ou de 3-hydroxypropionate par fermentation du glucose dans des souches d'*E. coli* optimisées selon l'invention. Les paramètres utilisés sont les mêmes que dans l'exemple 1, à savoir : 1) un flux d'import de glucose à  $3 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , 2) un taux de croissance variable de 0, 0,15 et  $0,25 \text{ h}^{-1}$ , 3) un flux de la transhydrogénase membranaire (*pntAB*) variable et inférieur ou égal  $1 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . La valeur limite de flux de la transhydrogénase membranaire est déterminée à partir de la littérature (Hanson, 1979 ; Anderlund *et al.*, 1999 ; Emmerling *et al.*, 2002) ; 4) le flux de maintenance a été limité entre 5 et  $22 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

a) cas de la production de cystéine par fermentation du glucose

	$\mu = 0$	$\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
$\Delta(udhA, qor, pgi)$	0,66	0,37	0,09
$\Delta(udhA, qor, pgi)$ gapA-NADP dépendant	0,78	0,37	0,09
$\Delta(udhA, qor, pgi)$ <i>lpd</i> -NADP dépendant	0,78	0,37	0,09
$\Delta(udhA, qor, pgi)$ gapA-NADP dépendant <i>lpd</i> -NADP dépendant	0,78	0,37	0,09
$\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$	0,40	0,18	0,01
$\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$ gapA-NADP dépendant	0,62	0,30	0,06
$\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$ <i>lpd</i> -NADP dépendant	0,71	0,36	0,13
$\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$ gapA-NADP dépendant <i>lpd</i> -NADP dépendant	0,77	0,42	0,17

**Rendements optimaux théoriques de production de la cystéine**

**par des souches d'*E. coli* optimisées dans leur capacité de réduction du NADP<sup>+</sup>**

**(mol par mol de glucose)**

Afin d'améliorer encore le rendement optimal théorique des souches optimisées selon l'invention, des modifications supplémentaires peuvent être prises en compte, telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB* et *aceK*.

5 Dans la pratique pour obtenir de tels rendements, d'autres modifications devront être apportées aux souches optimisées selon l'invention, par exemple en surexprimant le gène *cysB* comme décrit dans le brevet WO0127307, ou en modifiant le gène *cysE* comme décrit dans le brevet EP0885962.

**b) cas de la production de 3-hydroxypropionate par fermentation du glucose**

10 La production de 3-hydroxypropionate est réalisée dans des souches d'*E. coli* contenant les gènes codant pour les enzymes de la voie de synthèse du 3-hydroxypropionate, par exemple la malonyl-coA reductase de *Chloroflexus aurantiacus* (Hügler et al., *Journal of Bacteriology*, 2002, 184 : 2404-2410).

	$\mu = 0$	$\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
$\Delta(udhA, qor, pgi)$	1,33	0,79	0,30
$\Delta(udhA, qor, pgi)$ gapA-NADP dépendant	1,76	0,99	0,30
$\Delta(udhA, qor, pgi)$ lpd-NADP dépendant	1,82	0,99	0,30
$\Delta(udhA, qor, pgi)$ gapA-NADP dépendant lpd-NADP dépendant	1,82	0,99	0,30
$\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$	1,62	0,66	0,03
$\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$ gapA-NADP dépendant	1,76	0,79	0,07
$\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$ lpd-NADP dépendant	1,79	0,84	0,07
$\Delta(udhA, qor, pfkA, pfkB)$ gapA-NADP dépendant lpd-NADP dépendant	1,79	0,84	0,07

Rendements optimaux théoriques de production de 3-hydroxypropionate

15 par des souches d'*E. coli* optimisées dans leur capacité de réduction du NADP<sup>+</sup>

## (mol par mol de glucose)

Afin d'améliorer encore le rendement optimal théorique des souches optimisées selon l'invention, des modifications supplémentaires peuvent être prises en compte, telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi *zwf*, *gnd*, *pntA*, *pntB* et *icd* et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi *edd*, *aceA*, *aceB* et *aceK*.

Exemple 14 : Calcul des rendements optimaux théoriques dans le cadre de procédés de fermentation chez *S. cerevisiae* ; application à la production d'hydrocortisone

10 L'exemple 12 montre que les modèles MetOpt® développés par la société sont applicables aux bioconversions et devraient plus généralement s'appliquer aux biotransformations telles que les fermentations.

15 A titre d'exemple, le modèle MetOpt®-Scere est appliqué à la production d'hydrocortisone par fermentation du glucose dans des souches de *S. cerevisiae* optimisées selon l'invention. Les paramètres utilisés sont les mêmes que dans l'exemple 1, à savoir : 1) un flux d'import de glucose à  $3 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , 2) un taux de croissance variable de 0, 0,15 et 0,25  $\text{h}^{-1}$ , 3) un flux de maintenance inférieur ou égal à  $22 \text{ mmol.g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ; 4) les réactions des aldéhydes déhydrogénases (ALD2, ALD3, ALD6) sont irréversibles et imposées dans le sens acétate + NAD(P)H  $\rightarrow$  acetaldehyde + NAD(P); 5) la levure ne possède pas d'activités équivalentes à *udhA* ou *pntA,B*.

Le modèle permet de prendre en compte la compartimentation mitochondriale et péricaryale.

Cette représentation des résultats permet de mettre en évidence l'apport réel de chacune des mutations apportées selon l'invention, dans l'amélioration de la production de NADPH et donc dans l'amélioration du flux de production d'hydrocortisone.

La production d'hydrocortisone est réalisée dans des souches de *S. cerevisiae* contenant les gènes codant pour les enzymes de la voie de synthèse de l'hydrocortisone (Szczepana et al., 2003, *Nature Biotechnology*, 21 : 143-149).

	$\mu = 0$	$\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$	$\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$
$\Delta(\text{ZTA1},\text{PGI1})$	0,12	0,08	0,06
$\Delta(\text{ZTA1},\text{PGI1}) \text{ TDH1,2,3-NADP dépendant}$	0,21	0,14	0,10

$\Delta(ZTA1,PGI1)$ LPD1-NADP dépendant	0,20	0,14	0,10
$\Delta(ZTA1,PGI1)$ TDH1,2,3-NADP dépendant LPD1-NADP dépendant	0,21	0,14	0,10

Rendements optimaux théoriques de production d'hydrocortisone par des souches de *S. cerevisiae* optimisées dans leur capacité de réduction du NADP<sup>+</sup>  
(mol par mol de glucose)

Les souches dont les gènes PFK1 et PFK2 sont délétés sont incapables de produire de l'hydrocortisone, voire ne sont pas viables. Ceci est dû au fait que la production d'hydrocortisone est davantage limitée par la demande en carbone que par le besoin en NADPH. Une solution consiste à permettre une légère expression d'une activité de type transhydrogénase chez la levure. Cependant, les modélisations montrent que le flux de production d'hydrocortisone ne sera jamais aussi bon que dans le cas d'une délétion du gène PGI1.

Afin d'améliorer encore le rendement optimal théorique des souches optimisées selon l'invention, des modifications supplémentaires peuvent être prises en compte, telles que la surexpression d'au moins un gène choisi parmi ZWF, SOL1, SOL2, SOL3, SOL4, GND1, GND2, IDP1, IDP2 et IDP3 et/ou la délétion d'au moins un gène choisi parmi ICL1, DAL7.

15

#### RÉFÉRENCES

- Anderson, E.H. (1946) Growth requirements of virus-resistant mutants of *Escherichia coli* strain "B", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128
- Baudin, A.; Ozier-Kalogeropoulos, O.; Denouel, A.; Lacroute, F. and Cullin, C. (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucl. Acids Res.* 21, 3329-3330
- Bocanegra, J.A. Scrutton, N.S. ; Perham, R.N. (1993) Creation of an NADP-dependent pyruvate dehydrogenase multienzyme complex by protein engineering. *Biochemistry* 32 : 2737-2740
- Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke JD. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. 14 :115-32.

- Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97** : 6640-6645
- Miller, 1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 5 • Sambrook et al. (1989 Molecular cloning : a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York
- Schaefer U.; Boos, W.; Takors, R.; Weuster-Botz, D. (1999) Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics., *Anal. Biochem.* **270** : 88-96
- 10 • Wach, A.; Brachat,A.; Pohlmann,R.; and Philippse, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*, Yeast 10, 1793-1808, 1994.

### REVENDICATIONS

1. Souche de microorganisme caractérisée en ce qu'elle comprend la limitation d'une ou plusieurs activité(s) oxydant le NADPH.
2. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'on limite une ou plusieurs activités oxydant le NADPH par la délétion d'un ou plusieurs gène(s) codant pour une quinone oxidoreductase et/ou une transhydrogénase soluble.
3. Souche selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend également des modifications permettant de favoriser une ou plusieurs activité(s) enzymatique(s) réduisant le NADP<sup>+</sup>.
4. Souche selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle comprend la délétion d'un ou plusieurs gène(s) codant pour une phosphoglucose isomérase et/ou une phosphofructokinase.
5. Souche selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle comprend également la modification d'un ou plusieurs gène(s) codant pour une dihydrolipoamide déshydrogénase et/ou une glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, afin qu'elle(s) utilise(nt) préférentiellement le NADP.
6. Souche selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle comprend également la surexpression d'un ou plusieurs gène(s) codant pour une glucose 6-phosphate déshydrogénase, une 6-phosphogluconolactonase, une 6-phosphogluconate déshydrogénase, une isocitrate déshydrogénase ou une transhydrogénase membranaire.
7. Souche selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comprend également la délétion d'un ou plusieurs gène(s) codant pour une 6-phosphogluconate déhydratase, une malate synthase, une isocitrate lyase ou une isocitrate déshydrogénase kinase/phosphatase.
8. Souche selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs gènes, endogène ou exogène, codant des enzymes impliquées dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt.
9. Souche selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs gènes marqueurs de sélection.
10. Souche selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les espèces suivantes : *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Brevibacterium sp.*,

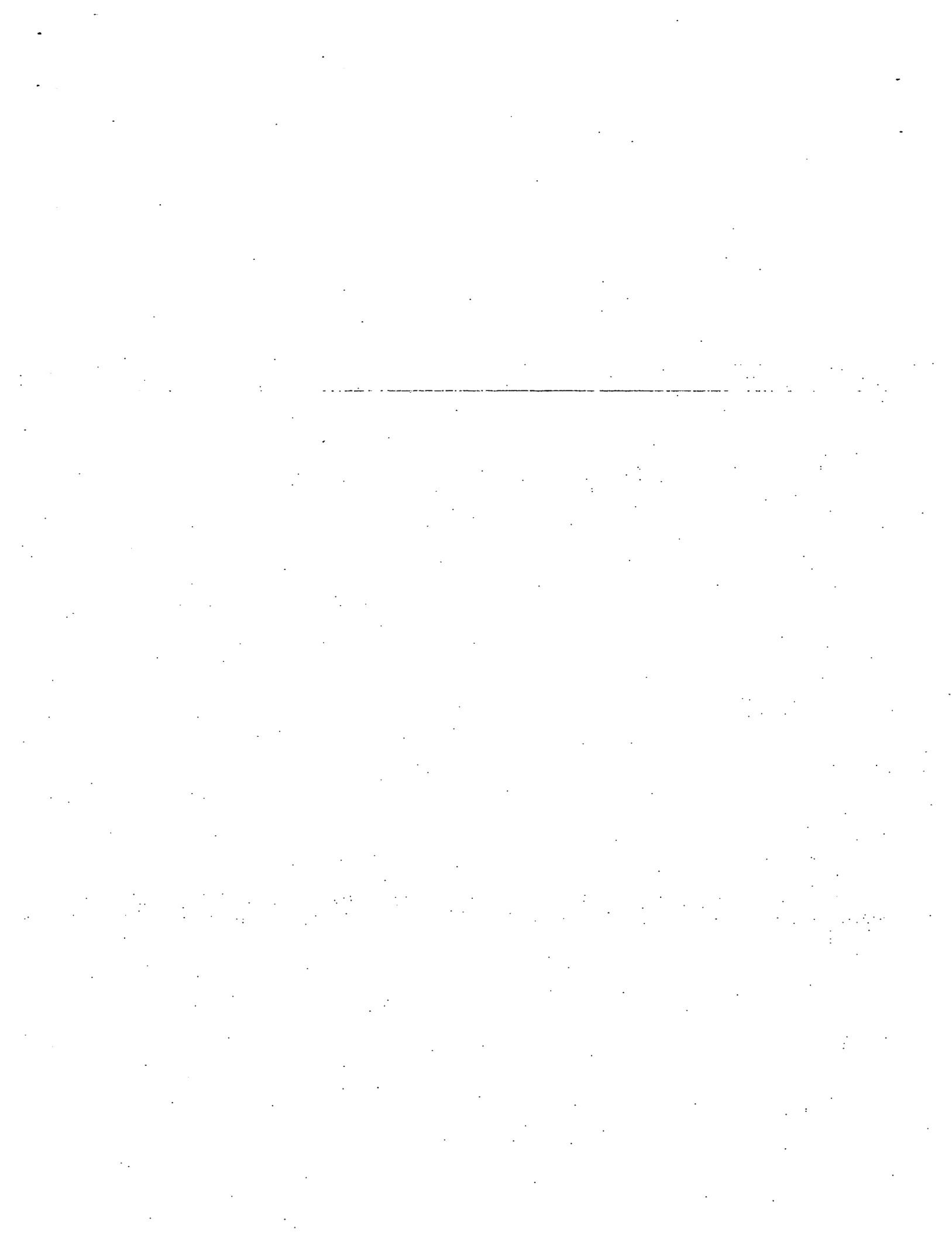
*Clostridium sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia sp.*, *Gluconobacter sp.*, *Penicillium sp.*, *Pichia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Streptomyces sp.*, *Xanthomonas sp.* et *Candida sp.*

11. Procédé de préparation des souches optimisées selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'on délète un ou plusieurs gène(s) codant pour une quinone oxidoreductase et/ou une transhydrogénase soluble, et le cas échéant on délète un ou plusieurs gène(s) codant pour une phosphoglucose isomérase, une phosphofructokinase, une 6-phosphogluconate déshydratase, une malate synthase, une isocitrate lyase ou une isocitrate déshydrogénase kinase/phosphatase, et/ou on modifie un ou plusieurs gène(s) codant pour une dihydrolipoamide déshydrogénase et/ou une glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, afin qu'elle(s) utilise(nt) préférentiellement le NADP, ces délétions et modifications étant réalisées par un moyen approprié, et/ou on surexprime un ou plusieurs gène(s) codant pour une glucose 6-phosphate déshydrogénase, une 6-phosphogluconolactonase, une 6-phosphogluconate déshydrogénase, une isocitrate déshydrogénase ou une transhydrogénase membranaire, soit en transformant la souche avec un vecteur approprié comprenant un ou plusieurs gène(s) codant une ou plusieurs enzyme(s) impliquées dans la biotransformation d'une molécule d'intérêt et/ou un ou plusieurs gène(s) marqueur de sélection, soit en modifiant la force du ou des promoteur(s) endogène(s) contrôlant le ou les gène(s) à surexprimer.

12. Procédé de production d'une molécule d'intérêt dont au moins une des réactions de la voie de biosynthèse est NADPH-dépendante, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) mise en culture des microorganismes optimisés selon l'une des revendications 1 à 10 dans un milieu de culture approprié favorisant leur croissance et comprenant les substances nécessaires pour la réalisation de la biotransformation par fermentation ou biotransformation, à l'exception du NADPH, et
- b) extraction de la molécule d'intérêt du milieu et le cas échéant purification.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la molécule d'intérêt est choisie parmi les acides aminés, les vitamines, les stérols, les flavonoïdes, les acides gras, les acides organiques, les polyols et les hydroxyesters.



10/577084

WO 2005/047498

PCT/FR2004/002848

SEQUENCE LISTING

1AP20 Rec'd URGENT 24 APR 2006

<110> METABOLIC EXPLORER

<120> Souches de microorganismes optimisées pour des voies de biosynthèses consommatrices de NADPH

<130> D21726

<150> FR 0313056

<151> 2003-11-06

<160> 38

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 100

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 1

ggtcgcgcg tcgcagttat cgagcgttat caaaatgttg gcggcggttg caccactgg 60

ggcaccatcc cgtcgaaagc catatgaata tcctccttag 100

<210> 2

<211> 100

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 2

cccaagaatct cttttgttcc ccgatggAAC aaaattttca gcgtgcccac gttcatgccg 60

acgatttgtg cgcgtgccag tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 3

ggccgctcag gatataGCCA gataaatgac 30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 4  
gcgggatcac tttactgcc a g c g c t g g c t g 30

<210> 5

<211> 100

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 5  
ggtggcccg a a g t a c t t c a a g c c g t a g a g t t c a c t c c t g c c g a t c c g g c g g a a t g a a 60  
a t c c a g g t c g a a a a t a a a g c c a t a t g a a t a t c c t c c t t a g 100

<210> 6

<211> 100

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 6  
c g c c c g g c t t c c a g a a t c t c a t g c g c a c g c t g c g c a t c c t t c a g c g g a t a t t c t g c t g 60  
c t c g g c g a c a t c g a c t t a a t g t a g g c t g g a g c t g c t t c g 100

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 7  
c g c c c a a c a c c g a c t g c t c c g c t t c g a t c g 30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 8  
c a g c g t t a t g a c c g c t g g c g t t a c t a a g g g 30

<210> 9

<211> 43

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 9  
acgtacgtgg catatgtcag ttttcgttcc aggtgctaac ggg 43

<210> 10

<211> 44

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 10  
acgtacctgc agttatattc tgccctcaaa ttttaaaatt tggg 44

<210> 11

<211> 100

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 11  
ccaacgcaga ccgctgcctg gcaggcacta cagaaacact tcgatgaaat gaaagacgtt 60  
acgatcgccg atcttttgc tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 12

<211> 100

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 12  
gcgccacgct ttatagcggt taatcagacc attggtcgag ctatcgtggc tgctgatttc 60  
tttatcatct ttcagctctg catatgaata tcctcccttag 100

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 13  
gcggggcggt tgtcaacgat ggggtcatgc 30

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 14

cggttatgatt tccgttaaat tacagacaag 30  
<210> 15  
<211> 102  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 15  
cgcgcgagac tagctctgct tatctcgccc ggatagaaca agcgaaaact tcgaccgttc 60  
atcgttcgca gttggcatgc ggtgtaggct ggagctgctt cg 102  
<210> 16  
<211> 98  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 16  
cgcaaggcgc tgaataattc acgtcctgtt cccacgcgtg acgcgctcag gtcaggaatg 60  
tgcggttcgc gagcagccca tatgaatatc ctcccttag 98  
<210> 17  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 17  
gggttagactc cattactgag gcgtgggcg 29  
<210> 18  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 18  
ccccggaatc agaggaatag tccc 24  
<210> 19  
<211> 100  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 19  
ggtgtgttga caagcgccgg tgatgcgcca ggcatgaacg ccgcaattcg cggggttgtt 60

cgttctgcgc tgacagaagg tgtaggctgg agctgcttcg 100  
<210> 20  
<211> 100  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 20  
ttcgcgcagt ccagccagtc acctttgaac ggacgcttca tgttttcgat agcgtcgatg 60  
atgtcgtggt gaaccagctg catatgaata tcctcccttag 100  
<210> 21  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 21  
cgcacgcggc agtcagggcc gacccgc 27  
<210> 22  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 22  
ccctacgccc cacttgttca tcgcccc 27  
<210> 23  
<211> 99  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 23  
gccccctctc tcgatagcgc aacaattacc ccgcaaattt atcccgaaagg aaaactgcgc 60  
tgtaccgcac cggtgttctgt gttaggctgga gctgcttcg 99  
<210> 24  
<211> 100  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 24  
gcgggaaagg taagcgtaaa tttttgcgt atcgtcatgg gagcacagac gtgtccctg 60

atggagtgtg gctgcactcc catatgaata tcctccttag 100  
<210> 25  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 25  
tggcaggatc atccatgaca gtaaaaacgg 30  
<210> 26  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 26  
gccgggttgca ctttggtaa gccccg 26  
<210> 27  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 27  
acgtacgtcc cccggggaaaa atgtcagttt tcgtttcagg tgc 43  
<210> 28  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 28  
acgtacgggc ccttatattc tgccctcaaa tttaaaaatt tggg 44  
<210> 29  
<211> 100  
<212> DNA  
<213> oligonucleotide synthétique  
<400> 29  
ccaacgcaga ccgctgcctg gcaggcacta cagaaacact tcgatgaaat gaaagacgtt 60  
acgatcgccg atcttttgc tgtaggctgg agctgctcg 100  
<210> 30

<211> 100

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 30

gccccacgct ttatagcggt taatcagacc attggtcgag ctatcgtag tcgtgatttc 60  
tttatacatct ttcagctctg catatgaata tcctcccttag 100

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 31

gcggggcggt tgtcaacgat ggggtcatgc 30

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 32

cggtagatt tccgttaaat tacagacaag 30

<210> 33

<211> 82

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 33

atgcaatctc aagattcatg ctacgggttt gcattcagat ctatcatcac aaatgtgaa 60  
aagcttcgta cgctgcaggcg 82

<210> 34

<211> 83

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 34

tttgtttca gcggctaaag cggctacctc agctctcaac tttaatctac cggacaggat 60  
gggccactag tggatctgat atc 83

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 35

gctttcttag aagctacctc cg

22

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 36

gaaccgacaa gaccaacaat gg

22

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 37

cagttgtaca ctttggaccc

20

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> oligonucleotide synthétique

<400> 38

gatcagcacc agtcaaagaa cc

22

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/002848

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	IPC 7 C12N9/02	C12P13/00	C12P7/00	C12P33/00
-------------------------------------	----------------	-----------	----------	-----------

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KERVINEN MARKO ET AL: "A pair of membrane-embedded acidic residues in the NuK subunit of Escherichia coli NDH-1, a counterpart of the ND4L subunit of the mitochondrial complex I, are required for high ubiquinone reductase activity." BIOCHEMISTRY, vol. 43, no. 3, 27 January 2004 (2004-01-27), pages 773-781, XP002324463. ISSN: 0006-2960 figure 2; table 1	1,2,10, 11
X	EP 1 170 376 A (AJINOMOTO CO., INC) 9 January 2002 (2002-01-09) example 2; table 2	1,2,9-13 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- \*X\* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 2005

Date of mailing of the international search report

02/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/002848

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	CALHOUN MELISSA W ET AL: "Demonstration of separate genetic loci encoding distinct membrane-bound respiratory NADH dehydrogenases in <i>Escherichia coli</i> " JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 175, no. 10, 1993, pages 3013-3019, XP009046383 ISSN: 0021-9193 the whole document -----	1,2,9-11
X	WO 98/02552 A (INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH LIMITED; BARROW, PAUL, ANDREW; TURNER, ART) 22 January 1998 (1998-01-22) page 2 - page 3; claims 1-7 -----	1,2,9-11
X	BERTSOVA YULIA V ET AL: "Noncoupled NADH:Ubiquinone oxidoreductase of <i>Azotobacter vinelandii</i> is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 183, no. 23, December 2001 (2001-12), pages 6869-6874; XP002324518 ISSN: 0021-9193 the whole document -----	1,2,9,11
X	PIEULLE L ET AL: "The gene encoding the NdhH subunit of type 1 NAD(P)H dehydrogenase is essential to survival of <i>synechocystis PCC6803</i> ." FEBS LETTERS. 29 DEC 2000, vol. 487, no. 2, 29 December 2000 (2000-12-29), pages 272-276, XP004337974 ISSN: 0014-5793 the whole document -----	1,2,9,11
X	MOLENAAR DOUWE ET AL: "Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of <i>Corynebacterium glutamicum</i> " JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 182, no. 24, December 2000 (2000-12), pages 6884-6891, XP002182880 ISSN: 0021-9193 page 6885; table 1 -----	1,2,9-11
-/-		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/002848

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FRERICHS-DEEKEN URSULA ET AL: "Functional expression of the quinoline 2-oxidoreductase genes (qorMSL) in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 pUF1 and in <i>P. putida</i> 86-1 deltaqor pUF1 and analysis of the Qor proteins." <i>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY / FEBS</i>, (2003 APR) 270 (7) 1567-77., April 2003 (2003-04), XP002274625 page 1568; table 1</p> <p>-----</p>	1,2,9-11
P,X	<p>SAUER UWE ET AL: "The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of <i>Escherichia coli</i>." <i>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY</i>. UNITED STATES 20 FEB 2004, vol. 279, no. 8, 20 February 2004 (2004-02-20), pages 6613-6619, XP002274624 ISSN: 0021-9258 table I</p> <p>-----</p>	1-4,9-11
X	<p>YAMAGUCHI MUTSUO ET AL: "Proton-translocating nicotinamide nucleotide transhydrogenase of <i>Escherichia coli</i>: Involvement of aspartate 213 in the membrane-intercalating domain of the beta subunit in energy transduction" <i>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY</i>, vol. 270, no. 28, 1995, pages 16653-16659, XP002324466 ISSN: 0021-9258 page 16654</p> <p>-----</p>	1,2,9-11
A	<p>MORITA TEPPEI ET AL: "Accumulation of glucose 6-phosphate or fructose 6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in <i>Escherichia coli</i>." <i>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY</i>, vol. 278, no. 18, 2 May 2003 (2003-05-02), pages 15608-15614, XP002274626 ISSN: 0021-9258 page 15613; tables I,IV</p> <p>-----</p>	
A	<p>NYUNOYA, HIROSHI ET AL: "Effects of sugars and polyols on basidiocarp formation in a phosphoglucose isomerase mutant of <i>Coprinus cinereus</i>" <i>CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY</i> (1984), 30(1), 45-51, 1984, XP009027484 abstract</p> <p>-----</p>	
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2004/002848

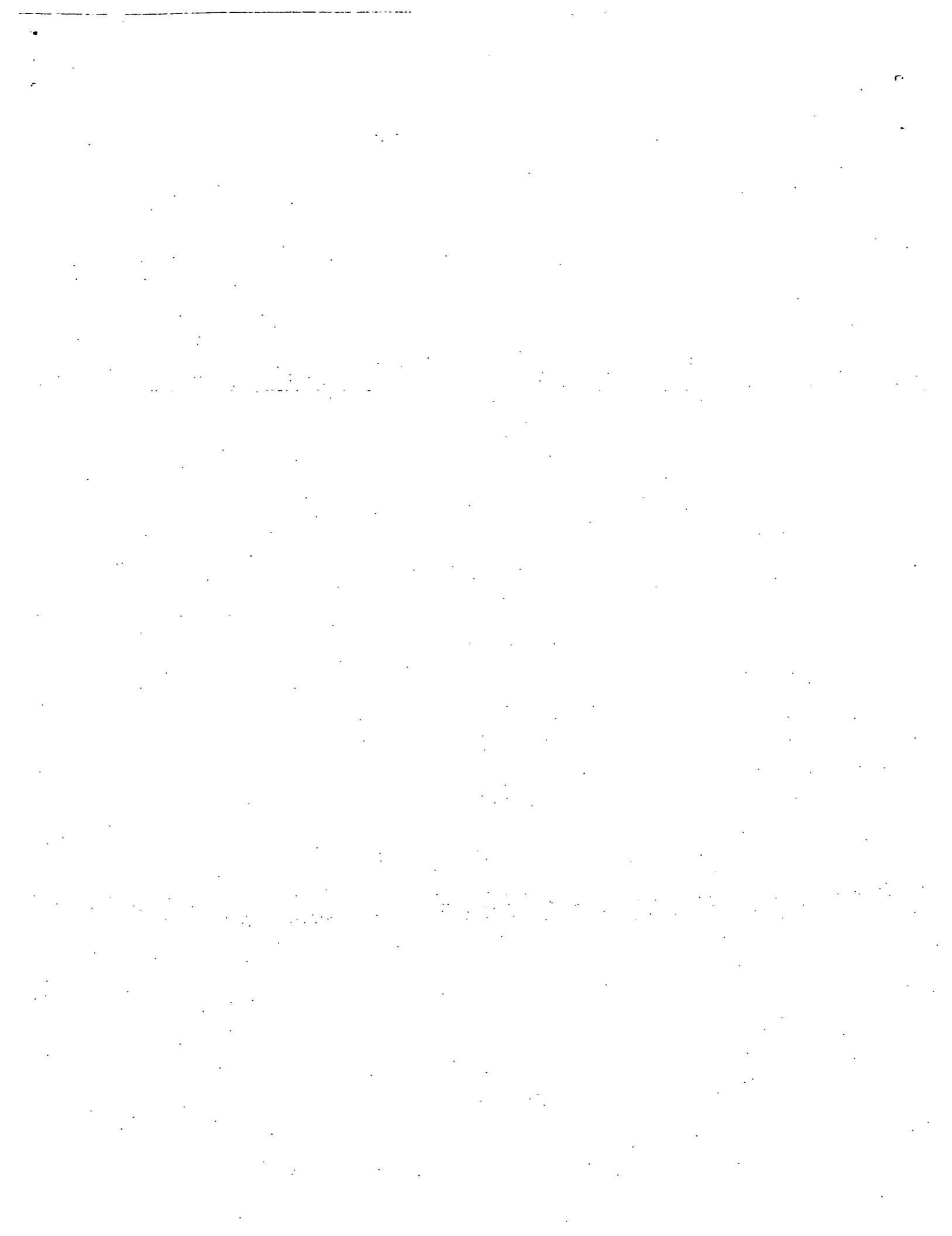
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category •	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARX ACHIM ET AL: "Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, (2003 SEP 4) 104 (1-3) 185-97, 4 September 2003 (2003-09-04), XP002263663 abstract page 195 - page 196	
A	BOLES E ET AL: "THE ROLE OF THE NAD-DEPENDENT GLUTAMATE DEHYDROGENASE IN RESTORING GROWTH ON GLUCOSE OF A SACCHAROMYCES CEREVISIAE PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASE MUTANT" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 217, no. 1, 1 October 1993 (1993-10-01), pages 469-477, XP000960373 ISSN: 0014-2956 abstract	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International	Application No
	PCT/FR2004/002848

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
EP 1170376	A 09-01-2002	JP 2002017363 A			22-01-2002
		AU 5416901 A			10-01-2002
		BR 0102666 A			26-02-2002
		CN 1335401 A			13-02-2002
		EP 1170376 A1			09-01-2002
		PL 348448 A1			14-01-2002
		RU 2238325 C2			20-10-2004
		US 2002160461 A1			31-10-2002
<hr/>					
WO 9802552	A 22-01-1998	AU 3452997 A			09-02-1998
		EP 0938565 A2			01-09-1999
		WO 9802552 A2			22-01-1998



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2004/002848

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N9/02 C12P13/00 C12P7/00 C12P33/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	KERVINEN MARKO ET AL: "A pair of membrane-embedded acidic residues in the NuoK subunit of Escherichia coli NDH-1, a counterpart of the ND4L subunit of the mitochondrial complex I, are required for high ubiquinone reductase activity." BIOCHEMISTRY, vol. 43, no. 3, 27 janvier 2004 (2004-01-27), pages 773-781, XP002324463 ISSN: 0006-2960 figure 2; tableau 1	1, 2, 10, 11
X	EP 1 170 376 A (AJINOMOTO CO., INC) 9 janvier 2002 (2002-01-09) exemple 2; tableau 2	1, 2, 9-13 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant porter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
15 avril 2005	02/05/2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé  Espen, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2004/002848

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
X	CALHOUN MELISSA W ET AL: "Demonstration of separate genetic loci encoding distinct membrane-bound respiratory NADH dehydrogenases in Escherichia coli" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 175, no. 10, 1993, pages 3013-3019, XP009046383 ISSN: 0021-9193 le document en entier	1,2,9-11
X	WO 98/02552 A (INSTITUTE FOR ANIMAL HEALTH LIMITED; BARROW, PAUL, ANDREW; TURNER, ART) 22 janvier 1998 (1998-01-22) page 2 - page 3; revendications 1-7	1,2,9-11
X	BERTSOVA YULIA V ET AL: "Noncoupled NADH:Ubiquinone oxidoreductase of Azotobacter vinelandii is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 183, no. 23, décembre 2001 (2001-12), pages 6869-6874, XP002324518 ISSN: 0021-9193 le document en entier	1,2,9,11
X	PIEULLE L ET AL: "The gene encoding the NdhH subunit of type 1 NAD(P)H dehydrogenase is essential to survival of <i>synechocystis</i> PCC6803." FEBS LETTERS. 29 DEC 2000, vol. 487, no. 2, 29 décembre 2000 (2000-12-29), pages 272-276, XP004337974 ISSN: 0014-5793 le document en entier	1,2,9,11
X	MOLENAAR DOUWE ET AL: "Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of <i>Corynebacterium glutamicum</i> " JOURNAL OF BACTERIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 182, no. 24, décembre 2000 (2000-12), pages 6884-6891, XP002182880 ISSN: 0021-9193 page 6885; tableau 1	1,2,9-11
	-/-	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2004/002848

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FRERICHS-DEEKEN URSULA ET AL: "Functional expression of the quinoline 2-oxidoreductase genes (qorMSL) in <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 pUF1 and in <i>P. putida</i> 86-1 deltaqor pUF1 and analysis of the Qor proteins." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY / FEBS, (2003 APR) 270 (7) 1567-77., avril 2003 (2003-04), XP002274625 page 1568; tableau 1	1,2,9-11
P,X	SAUER UWE ET AL: "The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of <i>Escherichia coli</i> ." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 20 FEB 2004, vol. 279, no. 8, 20 février 2004 (2004-02-20), pages 6613-6619, XP002274624 ISSN: 0021-9258 tableau I	1-4,9-11
X	YAMAGUCHI MUTSUO ET AL: "Proton-translocating nicotinamide nucleotide transhydrogenase of <i>Escherichia coli</i> : Involvement of aspartate 213 in the membrane-intercalating domain of the beta subunit in energy transduction" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 28, 1995, pages 16653-16659, XP002324466 ISSN: 0021-9258 page 16654	1,2,9-11
A	MORITA TEPPEI ET AL: "Accumulation of glucose 6-phosphate or fructose 6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in <i>Escherichia coli</i> ." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 18, 2 mai 2003 (2003-05-02), pages 15608-15614, XP002274626 ISSN: 0021-9258 page 15613; tableaux I,IV	
A	NYUNOYA, HIROSHI ET AL: "Effects of sugars and polyols on basidiocarp formation in a phosphoglucose isomerase mutant of <i>Coprinus cinereus</i> " CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY (1984), 30(1), 45-51, 1984, XP009027484 abrégé	

-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2004/002848

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MARX ACHIM ET AL: "Metabolic phenotype of phosphoglucose isomerase mutants of <i>Corynebacterium glutamicum</i>." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, (2003 SEP 4) 104 (1-3) 185-97., 4 septembre 2003 (2003-09-04), XP002263663 abrégé page 195 - page 196</p> <p>BOLES E ET AL: "THE ROLE OF THE NAD-DEPENDENT GLUTAMATE DEHYDROGENASE IN RESTORING GROWTH ON GLUCOSE OF A <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASE MUTANT" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 217, no. 1, 1 octobre 1993 (1993-10-01), pages 469-477, XP000960373 ISSN: 0014-2956 abrégé</p>	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No  
PCT/FR2004/002848

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1170376	A	09-01-2002	JP 2002017363 A AU 5416901 A BR 0102666 A CN 1335401 A EP 1170376 A1 PL 348448 A1 RU 2238325 C2 US 2002160461 A1	22-01-2002 10-01-2002 26-02-2002 13-02-2002 09-01-2002 14-01-2002 20-10-2004 31-10-2002
WO 9802552	A	22-01-1998	AU 3452997 A EP 0938565 A2 WO 9802552 A2	09-02-1998 01-09-1999 22-01-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**